

王志, 潘启华, 陆可, 等. 青鳉抗病毒感染过程的负调控因子 *jun* 的鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(6): 152-160.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.019

青鳉抗病毒感染过程的负调控因子 *jun* 的鉴定

王志¹, 潘启华^{1,2}, 陆可¹, 罗君志¹,
夏必琳¹, 姜正正¹, 申萍¹, 刘红¹, 陈天圣^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070;

2. 集美大学水产学院/农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 厦门 361021

摘要 Jun(Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit)为组成转录因子 AP-1 的亚单位或亚家族成员,参与机体的免疫应答。为了进一步了解 *jun* 基因在鱼类抗病毒天然免疫方面的功能,以日本青鳉为研究对象,采用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术获得 *jun* 缺失的纯合子突变体品系,并对其在神经坏死病毒(nervous necrosis virus, NNV)感染过程中的特征展开研究。基因克隆结果显示,野生型日本青鳉的 *jun* 基因编码区全长 921 bp,共编码 306 个氨基酸,含有 N 端的 Jun 超家族结构域和 C 端的 bZIP 超家族结构域,并在眼、脑、鳃、心脏、头肾、卵巢、精巢、肝脏、脾脏 9 个检测的组织中均有较高的表达。突变体 *jun*^{-/-} 在基因组减少了 124 bp,而蛋白只剩下 59 个氨基酸的 N 端序列,缺失了 Jun 超家族结构域和 bZIP 结构域。病毒感染实验结果显示,*jun*^{-/-} 仔鱼对于神经坏死病毒(nervous necrosis virus, NNV)的耐受能力相对野生型仔鱼有所提升;*jun*^{-/-} 成鱼眼、脑、鳃和肌肉组织内的病毒相对含量都显著低于野生型。进一步的 qRT-PCR 结果显示,在 *jun*^{-/-} 青鳉中,*fosl1* 的表达极显著下调,*tbk1* 的表达降低,而 *irf3* 的表达极显著上调。以上结果表明,*jun* 缺失能增强青鳉耐受 NNV 病毒的能力,*jun* 基因可能是一个青鳉抗病毒信号通路的负调控因子。

关键词 先天性免疫; *jun*; 基因编辑; 日本青鳉; 抗病毒; 负调控因子

中图分类号 S 917; Q 959.471 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0152-09

宿主的原癌基因 *jun* (Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit)是一类表达广泛、多功能的转录调节因子,不仅和癌症、血管生成息息相关,也参与了机体的免疫调节和病毒的感染过程^[1-2]。Jun 属于转录因子激活剂蛋白 1 (activated protein 1, AP-1)的亚族^[1],包含 3 个重要的蛋白结构域:Delta 结构域、反式激活结构域和 DNA 结合与二聚化结构域^[2]。研究发现 JUN 能被 JNK (c-Jun N-terminal kinase)磷酸化激活,并与 JUND (JunD proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit)在肾上腺髓质素反应中二聚化形成 AP-1 参与到肿瘤的进程中^[3]。

研究表明 Jun 参与病毒相关的免疫调节通路^[4-6]。例如,在牛痘病毒(vaccinia virus, VACV)感染鼠胚胎纤维母细胞的实验中,病毒激活 *Jun* 的

表达,从而促进病毒早期复制,加速病毒的扩散^[7]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)*jun* 对具有先天性免疫功能的血蓝蛋白的转录调节至关重要^[8];此外,Jun 能结合到凡纳滨对虾基质金属蛋白酶 mmp-2(matrix metalloproteinase-2)启动子上,激活 mmp-2 的表达,而 mmp-2 又与许多的抗菌肽活性相关^[9]。在红唇胭脂鱼(*Liza haematocheila*)中,*jun* 和 *fos* 都能调节 *ap-1* 的启动子进而对免疫反应发挥重要作用^[10]。在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的 GS 细胞实验中,过表达突变型 *jun* 后,病毒的转录水平降低的同时细胞病变效应出现延迟^[11]。在禽类成纤维母细胞中,宿主和病毒编码的高致癌性蛋白 JUN(V-JUN)因具备分子的同源性,成为病毒复制过程中的重要媒介^[12]。以上文献表明,*jun* 是宿主抗病毒信号通路中潜在的负反馈

收稿日期: 2021-05-21

基金项目:国家自然科学基金项目(31771648, 31672653);集美大学科研基金项目(ZQ2020003);国家重点基础研究发展计划项目(2013CB967700)

王志, E-mail: 574131898@qq.com

通信作者: 陈天圣, E-mail: tiansheng.chen@jmu.edu.cn

因子,可能是鱼类分子抗病育种中的一个候选因子,需要进一步进行验证。

日本青鳉(*Oryzias latipes*)是一种生殖周期短、便于实验室养殖、具有公开的基因组、容易开展基因编辑育种的模式鱼类,对其基因的功能分析有助于养殖鱼类的基因功能验证^[13]。为了进一步了解 *jun* 基因在鱼类抗病毒天然免疫方面的功能,本研究以日本青鳉为研究对象,采用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术获得 *jun* 缺失的纯合子突变体品系,并对其在神经坏死病毒(nervous necrosis virus, NNV)感染过程中的特征展开研究,以期养殖鱼类的抗病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

日本青鳉为华中农业大学水产学院模式鱼类繁育实验室饲养的 HdrR 品系,养殖在水温 28℃、光照周期明:暗为 14 h:10 h 的循环水系统中^[14]。性成熟的青鳉通过自然繁殖的方式获得后代,胚胎放置于培养液中,在 28℃ 培养箱孵育^[13]。实验动物处理按照华中农业大学科学伦理委员会批准的规程进行。

1.2 *jun* 编码序列的鉴定

在 NCBI 上下载预测的青鳉 *jun* cDNA 序列(gene ID:LOC101173011),设计扩增编码区(coding sequence, CDS)的引物(表 1)。选择表达量高的性腺,采用 RNAiso Plus 试剂盒提取总 RNA,使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)经过反转录获得 cDNA。采用 Q5 高保真的 DNA 聚合酶(BioLabs, 美国)进行 PCR 扩增获得 *jun* 的 CDS 序列,反应条件为 94℃ 3 min;35 个循环:94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s;最后 72℃ 延伸 10 min。随后将扩增的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,确定大小正确后,回收目的片段连接到 pMD18-T(TaKaRa, 日本)载体,连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中,送阳性克隆至武汉擎科生物有限公司测序。

1.3 *Jun* 系统进化树的构建

在 NCBI 网站下载人、鼠、猪、斑马鱼和青鳉的 *Jun* 和同家族 *Junb*、*Jund* 的序列,通过 MEGA7 中的 ClustalW 方法进行蛋白的多序列比对,使用 Neighbor-joining 方法构建系统进化树,Bootstrap method 参数设置为 1 000。

1.4 *jun* 的表达模式分析

提取野生型青鳉成鱼的眼、脑、鳃、心脏、头肾、卵巢、精巢、肝脏、脾脏 9 个组织的总 RNA,反转录获得各个组织的 cDNA。设计引物 *jun* RT-F/RT-R(表 1),通过半定量 PCR 检测基因在各个组织表达,以 β -actin 基因作为内参。PCR 反应条件为:95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃, 25 个循环,延伸 10 s, 25 个循环。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上分离。

1.5 *jun* 突变体的构建

根据 NCBI 上的日本青鳉 *jun* 基因序列,在网站 <https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/> 上设计合适的敲除靶位点,选择分值高且脱靶风险小的靶点 *jun sg1/sg2 F*(表 1)。在靶序列 5'端前加 T7 启动子序列,在 3'端加 sgRNA scaffold 引物扩增序列,具体的 sgRNA(single guide RNA)的上游引物为:5' TGTAATACGACTCACTATAGG-(gRNA 20 nt)-GTTTTAGAGCTAGAAAT 3',下游引物为来自模板 pMD19T-sgRNA 的通用引物 gRNA-R(表 1)^[14],引物由武汉擎科生物技术有限公司合成。以 pMD19T-sgRNA 为模板用 PCR 扩增出双链的 sgRNA,反应条件如下:95℃ 30 s;95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 72℃ 10 s, 34 个循环,然后使用 T7 转录试剂盒(mMESSAGE mMACHINE™ T7 transcription kit, Thermofisher)转录出 sgRNA,并使用氯化锂沉淀法纯化回收 sgRNA。Cas9 mRNA 按照文献纯化制备,将 Cas9(300 ng/ μ L)和 sgRNA(50 ng/ μ L)的混合液注射到 1 细胞期的青鳉胚胎^[15]。在胚胎发育 4 d 后提取注射的部分胚胎 DNA,使用检测引物 *jun* DF/DR(表 1)PCR 扩增 *jun* 的靶位点片段,突变型的 PCR 产物与野生型的相比明显变短。将注射的 F0 胚胎养至成鱼。然后通过尾鳍检测 PCR 产物来筛选 F0 突变成鱼,将突变体 F0 代成鱼与野生型杂交,获得 F1 代突变体。将 F1 代养至成鱼,再通过单克隆测序筛选出 F1 代中突变一致的类型进行自交得到的 F2 代并养至成鱼,通过 PCR 筛选出 F2 代中的纯合子突变体,并将突变的纯合子繁殖扩大以供后续实验使用。

1.6 突变体 *jun*^{-/-} Δ 124 仔鱼和成鱼 NNV 攻毒实验和病毒定量分析

收取野生型青鳉胚胎,待仔鱼孵化出膜 3 d 后,每组 15 尾放入 35 mm 培养皿中加入总体积为 4 mL 的胚胎培养液。设置 0、2、10、50、100、200 μ L

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in the experiment

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence	目的片段大小/bp Size	基因序列号 Accession number
<i>jun</i> CDS F	ATGTCTAGAAAAATGGAAGC	918	
<i>jun</i> CDS R	GTAGCCTTGGAGCTGCTGTG		
<i>jun</i> RT F	GACGCCTCGAACTCGCAGA	133	LOC101173011
<i>jun</i> RT R	TGTCCAGAGCCTTCGAGCTGA		
<i>jun</i> DF	AAATGGAAGCGACTTTTACGA	477	
<i>jun</i> DR	GGCTGAAAGTGGCTAAGTTTGT		
<i>jun</i> sg1 F	ATCCTGACGTCGCCGATGTGGG		
<i>jun</i> sg2 F	GGACAGACAGTTGCTACCGGCGG		
gRNA R	AAAAGCACCGACTCGGTGCC		
<i>jun</i> qRT-F	CCACCCGACCCAGTTTCGT	171	
<i>jun</i> qRT-R	GAATCCCGCCGCTCTCACACC		
NNV RNA2 qRT-F	AAATGGTGGGAAAGCAGAACA	167	MN105076.1
NNV RNA2 qRT-R	CGAACACTCCAGCGACACA		
<i>fosl1</i> qRT-F	ACTTCGACCACGCAACAGG	192	XM_011479987
<i>fosl1</i> qRT-R	CTGTGGACCCATCGCCCTC		
<i>tbk1</i> qRT-F	GCATCGGCGTTACCTTCTACCAC	156	XM_023952315
<i>tbk1</i> qRT-R	CAATCTTGCCGTTTTTCGCTCT		
<i>irf3</i> qRT-F	TCGACTCTGAAGCAGGAATCACA	151	XM_011488068
<i>irf3</i> qRT-R	TCAGGCAACCCAGTTTCACCG		
β -actin qRT-F	TATCATTCGCCTGAAACCGAT	114	NM_001104808.1
β -actin qRT-R	CTTTGCACATGCCAGATCCG		

神经坏死病毒进行病毒浓度梯度的预实验,以确定半致死病毒剂量。实验中的 NNV 是笔者所在实验室从患病石斑鱼分离获得的,采用 RGNNV 的保守引物经过 PCR 扩增全长后测序,序列确定为 RGN-NV,其包含 2 条 RNA 链,分别为 RNA1(2.9 kb, NCBI 序列号 MZ053461)和 RNA2(1.4 kb, NCBI 序列号 MN105076.1),将病毒在石斑鱼 GE 细胞中扩增后保存于 -80°C (未发表)。

参考预实验数据对仔鱼进行病毒感染实验。试验设置空白对照组(野生青鲈仔鱼不加 NNV)、对照组(野生青鲈仔鱼加 NNV)和实验组($jun^{-/-}\Delta 124$ 突变体仔鱼加 NNV)。对照组和实验组均加入 $100\ \mu\text{L}$ NNV,每隔 12 h 观察记录每组的死亡数,实验共重复 7 次,最后绘制对照组和处理组的死亡曲线。

对成鱼进行病毒感染实验时,使用微量注射器从野生型(对照组)和突变体成鱼(实验组)的泄殖孔向腹腔内注射 $25\ \mu\text{L}$ NNV,每组注射 10 尾,感染 2 周后取样。由于 NNV 主要攻击神经组织密集的脑和眼组织,提取脑、眼、鳃和肌肉 4 个组织 RNA,通过 qRT-PCR 检测 $jun^{-/-}\Delta 124$ 和野生型各组织中 NNV 病毒的相对复制量(表 1)。

1.7 $jun^{-/-}\Delta 124$ 相对于野生型在不同条件下干扰素相关基因的表达

设计与干扰素通路相关的 4 个基因 *jun*、*fosl1* (FOS-like antigen 1)、*tbk1* (TANK-binding kinase 1)、*irf3* (interferon regulatory factor 3) 的 qRT-PCR 引物(表 1),检测在 NNV 病毒诱导下, $jun^{-/-}\Delta 124$ 和野生型的个体中各基因的表达。实验对象为孵化出膜 3 d 的仔鱼,共设置 4 组。即野生对照组(野生青鲈仔鱼不加 NNV 诱导)、野生实验组(野生青鲈仔鱼加 NNV 诱导)、突变体对照组(突变体青鲈仔鱼不加 NNV 诱导)和突变体实验组(突变体青鲈仔鱼加 NNV 诱导)。每组 10 尾鱼,NNV 诱导剂量为 $100\ \mu\text{L}$ 。病毒诱导 4 d 后取样,用 qRT-PCR 检测 4 组样品中各基因的表达。

每组各取 3 尾鱼进行检测,同时设置阴性空白对照。使用 β -actin 作为内参基因,基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。

1.8 统计学分析

试验数据均用“平均值 $\pm$ 标准差”表示,并用 GraphPad Prism 5 软件 *t*-tests 中的 Two-tailed 对实验结果进行统计学分析,显著性差异设为 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 青鲮 *jun* 基因的 CDS 序列

采用高保真 DNA 聚合酶,使用表 1 中的引物,PCR 扩增后得到目的条带约为 1 000 bp 的 *jun* CDS

片段,克隆到 T 载体后,对目的条带进行测序。测序获得的青鲮 *jun* 的 CDS 由起始密码(ATG)到终止子(TAG)全长为 921 bp,共编码 306 个氨基酸(amino acid, aa),包括 N 端(5~209 aa)的 Jun 超家族结构域和 C 端(230~290 aa)的 bZIP 超家族结构域(图 1)。



jun CDS 序列和对应的蛋白序列,扩增引物用下划线标注,红色碱基为 gRNA 序列,灰色为 Jun 超家族结构域;黄色为 bZIP 结构域。The *jun* CDS sequence and the deduced protein sequences; underline: amplified primers; red bases: gRNA sequences; gray: Jun-like transcription factor domain; yellow: bZIP domain.

图 1 青鲮 *jun* 的 CDS 和蛋白序列

Fig.1 CDS and protein sequence of medaka *jun* gene

2.2 Jun 的系统进化关系

通过系统进化分析可以看出,Jun、Junb 和 Jund 在各支内都表现为硬骨鱼纲的青鲮和斑马鱼亲缘关系更近,而哺乳纲的人、鼠、猪亲缘关系更近(图 2)。

2.3 *jun* 表达模式

以 β -actin 为内参,对眼、脑、鳃、心脏、头肾、卵巢、精巢、肝脏、脾脏 9 个组织内 *jun* 的基因表达进行半定量 PCR 检测,发现其在所检测的 9 个组织中都表现出较高的表达水平,检测结果如图 3 所示。

2.4 *jun* 突变体品系构建

通过显微注射将合成好的靶点 sgRNA1 (5' ATCCTGACGTCGCCCCGATGT3')/sgRNA2 (5' GGACAGACAGTTGCTACCGG3')和 Cas9 mRNA 共注射到早期胚胎,经过 F0 代突变体亲本筛选、F1 代同种突变类型杂合子单克隆筛选和 F2 代纯合子突变体筛选,获得了 *jun* 缺失 124 个碱基的纯合子的突变体品系(MT: *jun*^{-/-} Δ124)。对该突变体品系的

DNA 和蛋白结构进行预测(图 4),发现突变体蛋白缺失了 Jun 家族结构域和 bZIP 结构域,在第 59 个氨基酸处出现翻译终止,为有效的突变类型。

2.5 *jun*^{-/-} Δ124 仔鱼和成鱼的 NNV 病毒攻毒结果

根据最终获得的死亡曲线(图 5A)可以看出 *jun*^{-/-} Δ124 突变体品系相对于野生型具有明显的抗病毒效果。仔鱼死亡的判别依据:躯体明显腐坏呈骨架状或肿大,仔鱼眼睛明显肿大且眼间距增大,仔鱼的尾部明显弯曲,鳃点消失(图 5B)。另外,在成鱼的病毒感染实验中,在突变体的眼(图 5C)、脑(图 5D)、鳃(图 5E)和肌肉(图 5F)中 NNV 的 RNA2 基因的表达明显低于野生对照组。这说明 *jun*^{-/-} Δ124 突变体的 NNV 病毒量较少,因此突变体相较于野生型对 NNV 更为耐受。

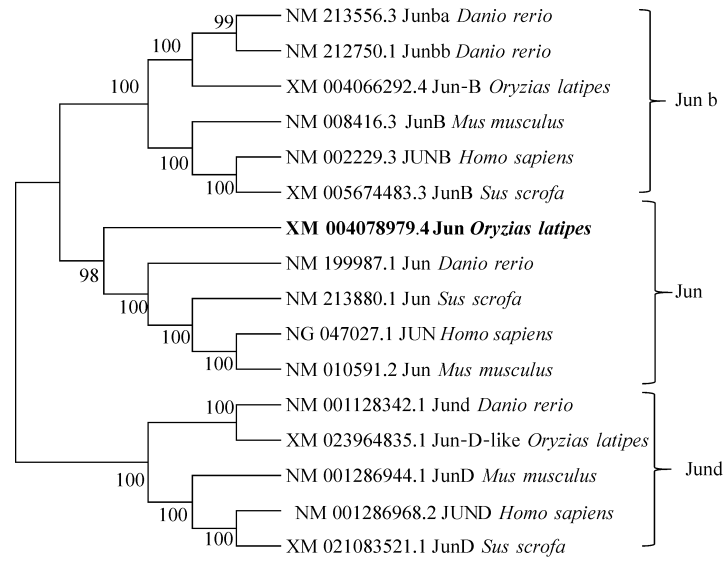
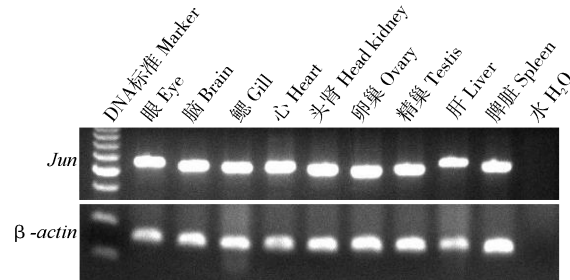


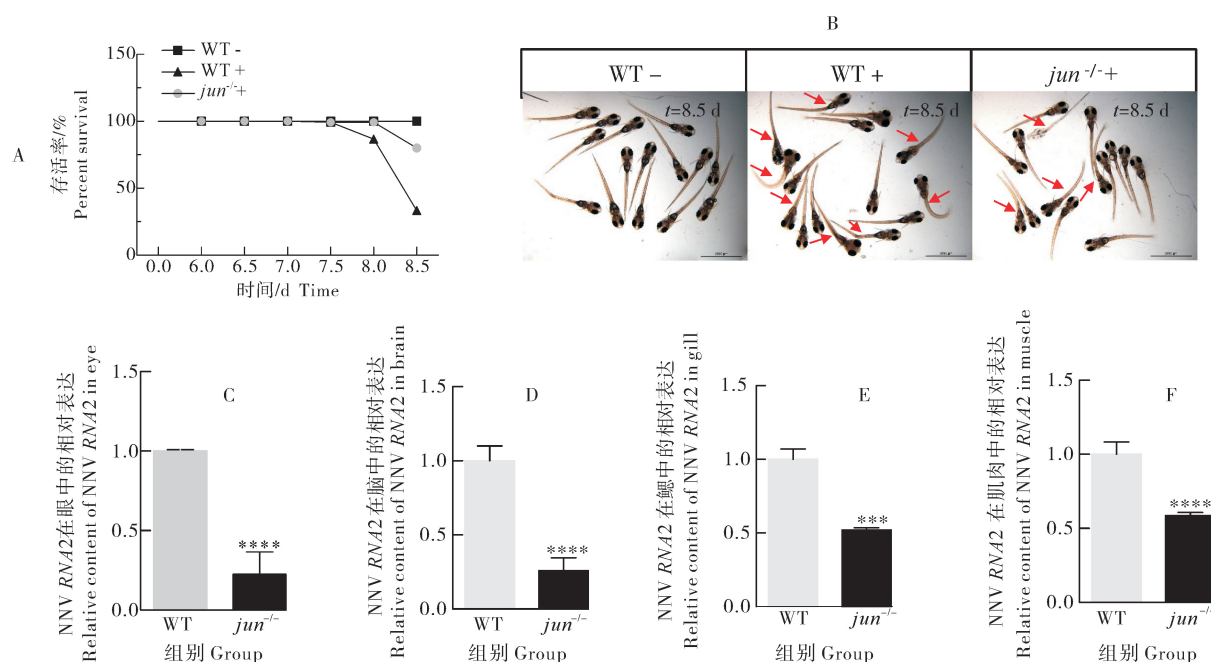
图 2 3 个 Jun 家族的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of three Jun families

图 3 青鳞组织中 *jun* 的表达模式Fig.3 Expression pattern of *jun* in various medaka tissues

A.青鳞 *jun*; B.突变体 *jun*^{-/-}Δ124 的筛选过程, 红色为纯合子突变体; C.突变体的序列对比, 红色为缺失 124 bp 突变体; D.青鳞野生型和突变型 *jun*^{-/-}Δ124 的蛋白结构域。A.The medaka *jun* gene; B.PCR screening result of mutant *jun*^{-/-}Δ124, -124 bp mutant were labeled by red color; C.Sequence comparison of WT and mutants, *jun*^{-/-}Δ124 as indicated by red arrow; D.The protein domain of wild-type (WT) and *jun*^{-/-}Δ124 (MT).

图 4 青鳞 *jun* 基因敲除后 DNA 和蛋白结构域的对比Fig.4 Comparison of DNA and protein domains after knockout of medaka *jun* gene



A.攻毒期间仔鱼的存活率;B.从 NNV 处理开始经历 8.5 d 三组仔鱼的存活情况,死亡的仔鱼用红色箭头标出;C-F.NNV 病毒 RNA2 基因在眼、脑、鳃和肌肉中的表达。误差线表示平均值±标准偏差,*** $P<0.0001$ 。A.Survival rate of larvae during challenge; B.After 8.5 d from NNV treatment, the survival of larvae in the three groups, dead larvae were marked with red arrows; C-F.Expression of RNA2 gene of NNV virus in eye, brain, gill and muscle. The error line represents the mean $\pm$ standard deviation, *** $P<0.0001$.

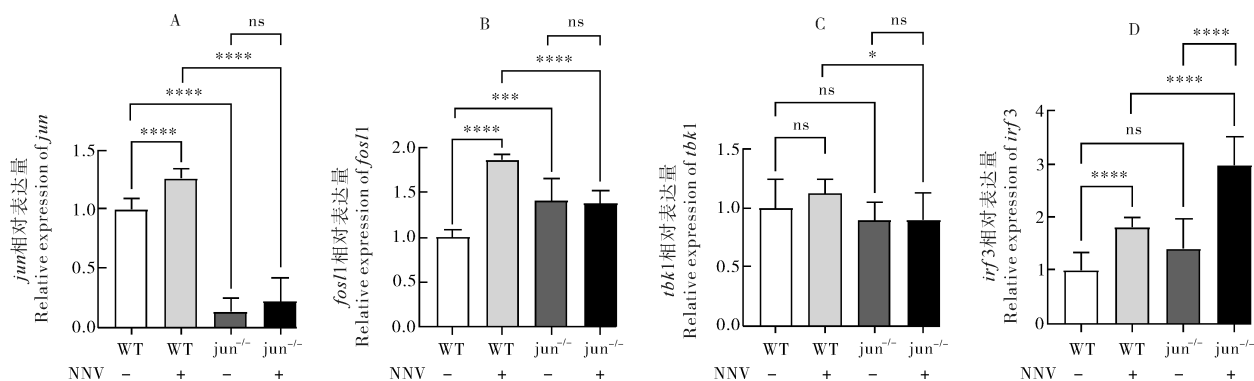
图5 *jun*^{-/-} Δ124 青鲮仔鱼和成鱼的 NNV 病毒感染实验

Fig.5 NNV infection experiment of *jun*^{-/-} Δ124 medaka larvae and adult fish

2.6 *jun*^{-/-} Δ124 干扰素相关基因的表达

通过 qRT-PCR 检测干扰素相关基因 *jun*、*fosl1*、*tbk1*、*irf3* 在 NNV 诱导下的野生型和突变体内的表达情况,发现在病毒诱导后,野生型内的相关基因表达都有不同程度的上调,说明这些基因参与了抗病毒免疫反应。*jun* 在 *jun*^{-/-} Δ124 突变体中的表达极显著降低($P<0.0001$) (图 6A),说明

jun 的表达在突变体内受阻;在无病毒诱导情况下, *jun*^{-/-} Δ124 突变体中 *fosl1* 的表达相对于野生型有极显著增高($P<0.001$),但在病毒诱导下相对于野生型的表达极显著降低($P<0.0001$),而在 *jun*^{-/-} Δ124 突变体中 *fosl1* 的表达在病毒诱导或不诱导下均没有显著差异(图 6B);在无病毒诱导下, *tbk1* 在 *jun*^{-/-} Δ124 突变体中的表达相对于野



A-D.NNV 诱导下 *jun*、*fosl1*、*tbk1*、*irf3* 在 *jun*^{-/-} Δ124 和野生型中的相对表达。误差线表示平均值±标准偏差, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。A-D.Relative expression of *jun*、*fosl1*、*tbk1*、*irf3* in *jun*^{-/-} Δ124 and WT induced by NNV. Error bars represent mean $\pm$ SD. * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

图6 NNV 诱导后野生型和 *jun*^{-/-} Δ124 干扰素相关基因的相对表达

Fig.6 Relative expression of interferon-related genes in WT and *jun*^{-/-} Δ124 induced by NNV

生型没有显著差异,但在病毒诱导下相对于野生型也有降低($P < 0.05$),同时在 $jun^{-/-}$ $\Delta 124$ 突变体中 *tbk1* 的表达在有无病毒诱导下两者也没有显著差异(图 6C); *irf3* 在不诱导的条件下,在 $jun^{-/-}$ $\Delta 124$ 突变体中相对野生型没有显著差异,但是在病毒诱导的突变体内 *irf3* 的表达水平有极显著的上调($P < 0.0001$),同时在突变体 $jun^{-/-}$ $\Delta 124$ 中病毒诱导之后的表达量极显著升高($P < 0.0001$) (图 6D)。

3 讨 论

宿主的 *jun* 是机体参与病毒感染和免疫调节的一个重要因子。本研究克隆了青鳉的 *jun* 基因,并通过基因编辑技术构建了突变体,初步研究发现其具有明显的抗病毒效果,而且突变体成鱼体内的病毒相对含量要比对照组显著降低,因此认为青鳉的 *jun* 是病毒感染过程中的负反馈因子。

转录因子 AP-1 由许多的同源或异源的二聚体结合形成,包含 bZIP (basic region leucine zipper, bZIP) 转录因子家族结构域的成员,比如 Jun、Fos、Atf^[16]。研究发现,很多致癌性的病毒通过编码病毒 bZIP 转录因子来影响宿主细胞的免疫反应,使得病毒的复制更为有利^[17]。在本研究中鉴定的青鳉 *jun* 基因,其蛋白结构含有经典的 Jun 超家族结构域和 bZIP 结构域,其蛋白序列进化关系和泛表达模式也符合 *jun* 基因的特性。在突变体青鳉中,在 59 aa 处 Jun 蛋白翻译终止,导致其完全缺失 bZIP 蛋白结构域,这可能是突变体具有抗病毒效果的重要原因。

干扰素相关基因 *fosl1*、*tbk1*、*irf3* 也都与病毒的感染有关。三磷酸腺苷依赖解旋酶 DDX3 (DEAD-box RNA helicase) 是一种熟知的能够抑制乙肝病毒的宿主因子,它能够通过 TBK1/IKK ϵ (Inhibitor of kappa B kinase ϵ)/IRF^[18] 和干扰素 β 启动子刺激因子增强机体的先天性免疫。人参皂苷能够通过 Akt (又称 PKB, Protein kinase B)/p53 (Interleukin-12A) 通路刺激 DDX3 的启动子活性进而激活 TBK1/IKK ϵ /IRF 信号并增强先天性免疫应答^[19]。研究还发现人参皂苷能够通过抑制 JNK/AP-1 通路进而阻滞乙肝病毒的复制^[20]。此外,研究表明 JNK 能够磷酸化激活 Jun,进而促进 AP-1

的合成^[3]。因此, TBK1 和 c-Jun/AP-1 在功能上可能存在拮抗关系,当 *jun* 敲除之后,机体内的 *jun* 表现为低水平的状态,所以在 *jun* 突变体中的 *tbk1* 的表达水平也处在一个相对低的水平。*fosl1* 能够通过阻滞 TBK1 和 TRAF3/TRIF (TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon β) 的互作抑制 I 型干扰素的表达^[21]。本研究通过 qRT-PCR 结果分析发现, *fosl1* 本身能被病毒诱导而表达增高,但在突变体中,在缺少了 *jun* 的抑制作用后,干扰素表现为高水平状态。而 *tbk1* 在突变体或者 NNV 病毒诱导下表达都显著降低,因此, *fosl1* 也处于较低水平,但 *fosl1* 并不能直接抑制干扰素的表达。且在突变体内有无病毒的诱导, *fosl1* 和 *tbk1* 的表达都没有显著变化,说明 *fosl1* 和 *tbk1* 的表达可能与 *jun* 无直接的联系。此外, *irf3* 是调节 I 型干扰素合成的转录因子,能诱导 IFN β 的表达,是机体病毒免疫应答的关键调控因子^[22]。在免疫细胞中普遍表达的赖氨酸乙酰转移酶 Kat8 能够乙酰化 *irf3* 进而降低 *irf3* 的转录活性,导致 *ifn-1* 的表达降低。同时, Kat8 敲除的小鼠对病毒的耐受力获得增强^[23]。在鲫 (*Carassius auratus* L.) 中, *irf3* 的过表达会激活 Ifn 的产生,而过表达突变 *irf3* 则因为抑制了 IFN 的产生,破坏了 poly-IC 激活干扰素刺激基因的反应^[24]。以上多个研究都表明, *irf3* 能够直接参与干扰素的产生,缺失 *irf3* 的突变体中的病毒耐受能力明显变差。在本研究中,敲除 *jun* 基因后,受到病毒感染后机体 *irf3* 的表达相对于野生型极显著上调,同时在突变体内 *irf3* 的表达量在病毒诱导的条件下相对于无病毒诱导组也极显著地上调。这说明 *jun* 的缺失可能直接导致了 *irf3* 的上调, Jun 可以通过抑制 Irf3/Ifn 通路抑制干扰素的表达。因此,突变体病毒耐受能力的提高可能是通过 Irf3 调控的信号通路增强了干扰素表达的结果。

综上所述,本研究推断青鳉 *jun* 基因可能是宿主在抗病毒感染过程中的负调控因子,可作为抗病育种改良的候选基因。

参考文献 References

- [1] BOHMANN D, BOST J, ADMON A, et al. Human proto-oncogene c-Jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1[J]. Science,

- 1987,238(4832):1386-1392.
- [2] 张令强,贺福初.c-Jun/激活蛋白-1 活性调节研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2002,29(6):872-876.ZHANG L Q, HE F C.The progress in regulation of c-Jun/AP-1[J].Progress in biochemistry and biophysics,2002,29(6):872-876(in Chinese with English abstract).
- [3] OUAFIK L,BERENGUER-DAIZE C,DE BERTHOIS Y.Adrenomedullin promotes cell cycle transit and up-regulates cyclin D1 protein level in human glioblastoma cells through the activation of c-Jun/JNK/AP-1 signal transduction pathway[J].Cellular signalling,2009,21(4):597-608.
- [4] MITTAL R,KUMAR K U,PATER A,et al.Differential regulation by c-Jun and c-fos protooncogenes of hormone response from composite glucocorticoid response element in human *Papilloma* virus type 16 regulatory region[J].Molecular endocrinology,1994,8(12):1701-1708.
- [5] ZHANG H P,NIU X F,QIAN Z K,et al.The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 inhibits human *Cytomegalovirus* replication[J].Journal of medical virology,2015,87(12):2135-2144.
- [6] ZHANG Z P,ZHANG S P,WANG S H.DNAzymes Dz13 target the c-Jun possess antiviral activity against influenza A viruses[J].Microbial pathogenesis,2017,103:155-161.
- [7] LEITE F G G,TORRES A A,OLIVEIRA L C,et al.C-Jun integrates signals from both MEK/ERK and MKK/JNK pathways upon vaccinia virus infection[J].Archives of virology,2017,162(10):2971-2981.
- [8] YANG P K,YAO D F,AWEYA J J,et al.C-Jun regulates the promoter of small subunit hemocyanin gene of *Litopenaeus vannamei*[J].Fish & shellfish immunology,2019,84:639-647.
- [9] LIAN Y Y,HE H H,ZHANG C Z,et al.Functional characterization of a matrix metalloproteinase 2 gene in *Litopenaeus vannamei*[J].Fish & shellfish immunology,2019,84:404-413.
- [10] JANSON N D,JEHANATHAN N,JUNG S,et al.Insight into the molecular function and transcriptional regulation of activator protein 1 (AP-1) components c-Jun/c-Fos ortholog in red lip mullet (*Liza haematocheila*) [J].Fish & shellfish immunology,2019,93:597-611.
- [11] WEI S N,HUANG Y H,HUANG X H,et al.Characterization of c-Jun from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection[J].Fish & shellfish immunology,2015,43(1):230-240.
- [12] HARTL M,BADER A G,BISTER K.Molecular targets of the oncogenic transcription factor Jun[J].Current cancer drug targets,2003,3(1):41-55.
- [13] CHEN T S,CAVARI B,SCHARTL M,et al.Identification and expression of conserved and novel RNA variants of medaka *pax6b* gene[J].Journal of experimental zoology.Part B,Molecular and developmental evolution,2017,328(5):412-422.
- [14] WINKLER C,VIELKIND J R,SCHARTL M.Transient expression of foreign DNA during embryonic and larval development of the medaka fish (*Oryzias latipes*) [J].Molecular and general genetics MGG,1991,226(1/2):129-140.
- [15] FANG J,CHEN T S,PAN Q H,et al.Generation of albino medaka (*Oryzias latipes*) by CRISPR/Cas9[J].Journal of experimental zoology.Part B,Molecular and developmental evolution,2018,330(4):242-246.
- [16] SHAULIAN E,KARIN M.AP-1 as a regulator of cell life and death[J].Nature cell biology,2002,4(5):E131-E136.
- [17] STOLZ M L,MCCORMICK C.The bZIP proteins of oncogenic viruses[J/OL].Viruses,2020,12(7):757[2021-05-21].https://doi.org/10.3390/v12070757.
- [18] SCHRÖDER M,BARAN M,BOWIE A G.Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKε-mediated IRF activation[J].The EMBO journal,2008,27(15):2147-2157.
- [19] CHOI Y J,KANG L J,LEE S G.Stimulation of DDX3 expression by ginsenoside Rg3 through the Akt/p53 pathway activates the innate immune response via TBK1/IKKε/IRF3 signaling[J].Current medicinal chemistry,2014,21(8):1050-1060.
- [20] KANG L J,CHOI Y J,LEE S G.Stimulation of TRAF6/TAK1 degradation and inhibition of JNK/AP-1 signaling by ginsenoside Rg3 attenuates hepatitis B virus replication[J].The international journal of biochemistry & cell biology,2013,45(11):2612-2621.
- [21] CAI B W,WU J,YU X,et al.FOSL1 inhibits type I interferon responses to malaria and viral infections by blocking TBK1 and TRAF3/TRIF interactions[J/OL].mBio,2017,8(1):e02161-16[2021-05-21].https://doi.org/10.1128/mbio.02161-16.
- [22] 季晓丽,张毓川,陈玮.IRF3 在抗病毒固有免疫应答中的作用及调控机制[J].中国免疫学杂志,2019,35(18):2289-2295.JI X L,ZHANG Y C,CHEN W.Regulation mechanism of Interferon regulatory factor-3 and its role in anti-virus innate immune response[J].Chinese journal of immunology,2019,35(18):2289-2295(in Chinese with English abstract).
- [23] HUAI W W,LIU X G,WANG C M,et al.KAT8 selectively inhibits antiviral immunity by acetylating IRF3[J].The Journal of experimental medicine,2019,216(4):772-785.
- [24] SUN F,ZHANG Y B,LIU T K,et al.Characterization of fish-IRF3 as an IFN-inducible protein reveals evolving regulation of IFN response in vertebrates[J].The journal of immunology,2010,185(12):7573-7582.

Molecular characterization of medaka (*Oryzias latipes*) *jun* as negative regulator during antiviral immune response

WANG Zhi¹, PAN Qihua^{1,2}, LU Ke¹, LUO Junzhi¹, XIA Bilin¹,
JIANG Zhengzheng¹, SHEN Ping¹, LIU Hong¹, CHEN Tiansheng^{1,2}

1.Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/
College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of
Agriculture and Rural Affairs/College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract Jun (Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit) is a subunit or subfamily member of the transcription factor AP-1 and play an important role in host immune response. To further understand the function of *jun* gene in natural antiviral immunity of fish, the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) was selected as the research fish model, and the homozygous mutant with *jun* deletion were obtained by CRISPR/CAS9 system and exposed to nervous necrosis virus (NNV) infection. Based on the gene cloning, the open reading frame of the medaka *jun* is 921 bp encoding 306 amino acids, containing N terminal jun super family structure domain and C terminal bZIP family structure domain. The RNA expression was highly detected in all examined tissues including the eyes, brain, gill, heart, kidney, ovary, testis, liver, and spleen. The mutant *jun*^{-/-} was reduced by 124 bp in the genome, leaving only 59 amino acids N-terminal sequences, and missing the Jun superfamily domain and bZIP domain. Antiviral experiments were then carried out on larval and adult fish of the mutant strain by administrating NNV. The results showed that the disease resistance of larval mutants was enhanced, and the relative content of virus in adult tissues including the eye, brain, gill and muscle were significantly lower than in the wild type. The expression of *jun* and interferon-related genes *fosl1*, *tbk1* and *irf3* that was induced by NNV virus were detected by qRT-PCR. It was found that the expression of *jun* in the mutant was blocked compared to the wild type, the expression of *fosl1* and *tbk1* was differentially reduced, while the expression of *irf3* was significantly up-regulated, indicating that the inhibition of *jun* expression may promote the release of *irf3*. These results suggest that the *jun* mutant has the ability of virus tolerance, and *jun* may be a negative regulator of the antiviral signaling pathway.

Keywords innate immune; *jun*; gene editing; medaka (*Oryzias latipes*); anti-virus; negative regulator

(责任编辑:边书京)